ELISA para HTLV I/II 3.0

CE
0123

FECHA DE REVISIÓN: 11/05
MBN 0011-SPN-1

Nota: Cambios resaltados.

REF
21080-096T : (kit de 96 análisis)
21080-192T : (kit de 192 análisis)
21080-480T : (kit de 480 análisis)

NOMBRE Y USO PREVISTO

El ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MP Diagnostics (MPD) es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas diseñado para la detección de anticuerpos frente a los virus HTLV-I y HTLV-II en suero o plasma humanos. Su uso previsto es como prueba de despistaje, y es necesario volver a analizar las muestras inicialmente reactivas.

INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos recientes llevados a cabo en Estados Unidos y en Europa confirman la presencia de una prevalencia mixta del HTLV-I y del HTLV-II en distintas poblaciones de alto riesgo, como los usuarios de drogas intravenosas y los receptores de transfusiones. En función de la reactividad cruzada de los sueros anti-HTLV-I y anti-HTLV-II con lisados viral, los kits de análisis de primera generación utilizaban para los ensayos de detección selectiva lisado viral de HTLV-I, mientras que los de segunda generación utilizaban lisado viral de HTLV-I y antígenos recombinantes. Sin embargo, los inmunoensayos de detección selectiva de HTLV-I/II de primera y segunda generación basados en lisados víricos disponibles en la actualidad carecen de sensibilidad para la determinación del HTLV-II y presentan un elevado número de falsos positivos con sueros de personas no infectadas.

Para detectar tanto los anticuerpos frente al HTLV-I/II como los anticuerpos frente al HTLV-II es necesario utilizar un ensayo ELISA para HTLV-I/II muy sensible y específico.

El ensayo **ELISA para HTLV I/II 3.0 de MP Diagnostics** utiliza exclusivamente una combinación de antígenos recombinantes. Esta clase de análisis garantiza la detección tanto del HTLV-I como del HTLV-II por epítopos específicos.

El ensayo **ELISA para HTLV I/II 3.0 de MP Diagnostics** ha sido diseñado como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas cualitativo para la detección de anticuerpos frente a los virus HTLV-I y HTLV-II en suero o plasma humanos. Su uso previsto es como prueba de despistaje y es preciso volver a analizar las muestras inicialmente reactivas y confirmar el resultado de las muestras repetidamente reactivas con ensayos complementarios, como el ensayo de transferencia **Western BLOT 2.4 para HTLV-I/II 2.4 de MPD**.

DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

A continuación figuran los signos gráficos que aparecen en los envases y productos de **MP Diagnostics**, y que son los que se incluyen con más frecuencia en los dispositivos médicos y sus envases. Se explican con mayor detalle en la Norma británica y europea BS EN 980: 2003.

Usar antes de
Sinónimos:
Fecha de caducidad

Código de serie
Sinónimos:
Número de lote
Número de serie

Límite de temperatura

Fabricante

Contenido suficiente para <n> ensayos

No reutilizar

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Número de catálogo

Atención
Consulte las Instrucciones de uso

Representante autorizado en la Comunidad Europea

Consultar las instrucciones de uso

PRINCIPIOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO

Los pocillos de las tiras de las microplacas de poliestireno están recubiertos con una mezcla de antígenos recombinantes del HTLV-I y del HTLV-II que corresponden a segmentos muy antigénicos de los virus HTLV-I y HTLV-II. El suero o el plasma humanos, diluidos en solución tampón, se incuban en estos pocillos recubiertos. Cuando existen anticuerpos específicos anti-HTLV-I/II, dichos anticuerpos se unen a los antígenos inmovilizados en la fase sólida. Los pocillos se lavan minuciosamente para eliminar todo el producto no ligado y después se les añade anticuerpo de cabra anti-IgG humana purificado por cromatografía de afinidad y marcado con peroxidasa de rábano. Este anticuerpo marcado se une a los complejos antígeno-anticuerpo previamente formados; los anticuerpos marcados no ligados sobrantes se eliminan mediante lavado. A continuación, se añade a cada pocillo una solución sustrato con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Para detener la reacción se añade ácido clorhídrico. La intensidad del producto de reacción de color amarillo resultante se mide por espectrofotometría a 450 nm y es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

COMPONENTES DEL KIT

Descripción del componente		Cantidad suministrada	
MICROPLATE			
MICROPLACA DE HTLV Doce tiras de 8 pocillos por placa. Los pocillos de las microplacas contienen proteínas de HTLV-I y HTLV-II recombinantes adsorbidas. Conservar a 2 °C - 8 °C.	1 PLACA 96 análisis	2 PLACAS 192 análisis	5 PLACAS 480 análisis
CONTROL − ⚠			
CONTROL NO REACTIVO Suero humano normal, no reactivo para HCV, HIV-1/2, HTLV-I/II ni para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Contiene timerosal y azida sódica como conservantes. Contenido: 280 µl por vial. Conservar a 2 °C - 8 °C.	1 vial	2 viales	3 viales
CONTROL + ⚠			
CONTROL REACTIVO Suero humano normal inactivado con una concentración elevada de anticuerpos específicos frente a HTLV-I/II y no reactivo para HCV, HIV-1/2 ni HBsAg. Contiene timerosal y azida sódica como conservantes. Contenido: 300 µl por vial. Conservar a 2 °C - 8 °C.	1 vial	2 viales	4 viales
DILUENT ⚠			
DILUYENTE Solución Tris-NaCl con suero de cabra normal termotratado, seroalbúmina bovina y estabilizantes. Contiene Bronidox™ como conservante. Contenido: 100 ml por frasco. Conservar a 2 °C - 8 °C.	1 frasco	1 frasco	2 frascos
WASH PLATE 20X ⚠			
CONCENTRADO PARA EL LAVADO DE LA PLACA (20X) Solución salina tamponada con fosfato con Tween-20. Contiene cloroacetamida como conservante. Contenido: 120 ml por frasco. Conservar a 2 °C - 8 °C.	1 frasco	1 frasco	2 frascos
CONJUGATE T			
CONJUGADO Anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano. Contenido: 70 µl por vial. Conservar a 2 °C - 8 °C.	1 vial	2 viales	3 viales
SUBS TMB ⚠			
SUSTRATO El tampón contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Conservar en la oscuridad a 2 °C - 8 °C. Contenido: 12.5 ml por frasco.	1 frasco	2 frascos	5 frascos
SOLN STOP HCl 1N ⚠			
SOLUCIÓN DE PARADA Solución de ácido clorhídrico 1 N. Conservar en la oscuridad a 2 °C - 8 °C. Contenido: 30 ml por frasco.	1 frasco	1 frasco	2 frascos
TAPAS PARA PLACA Tapas adhesivas para cubrir la microplaca durante la incubación.	4 piezas	8 piezas	20 piezas
MANUAL DE INSTRUCCIONES	1 copia	1 copia	1 copia

** Bronidox es una marca registrada de Henkel Chemical Co.*

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* únicamente.
2. Para uso exclusivo por profesionales.
3. Consulte el prospecto del producto para obtener información sobre los componentes potencialmente peligrosos.

INFORMACIÓN SANITARIA Y DE SEGURIDAD

⚠ **PRECAUCIONES:** Este kit contiene productos de origen humano. Ningún método de análisis permite ofrecer una garantía absoluta de que los hemoderivados humanos no transmitan una infección.

MANIPULE LAS MUESTRAS Y LOS CONTROLES REACTIVOS Y NO REACTIVOS DEL ENSAYO COMO SI FUERAN POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Se recomienda manipular los componentes del ensayo y las muestras de conformidad con las prácticas correctas de laboratorio. Asimismo, deben desecharse siguiendo los procedimientos de seguridad establecidos.

El ***control reactivo*** y el ***control no reactivo*** contienen timerosal y azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el cobre y el plomo que se utilizan en ciertas tuberías y formar sales explosivas. Aunque las cantidades que se usan en este kit son pequeñas, los materiales que contienen azida deben eliminarse con volúmenes relativamente grandes de agua para evitar la acumulación de azidas metálicas en las tuberías. A continuación figuran las frases correspondientes a los riesgos (R) y la seguridad (S).

R20/21/22	Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
R32	En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
S7-32	Mantener en recipiente bien cerrado. No respirar los vapores.
S35	Elimine los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
S36	Use indumentaria protectora adecuada.
S46	En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

El ***Diluyente*** contiene Bronidox y Tris, clasificados como irritantes (Xi) por las directivas de la Comunidad Económica Europea (CEE) que son de aplicación. A continuación figuran las frases correspondientes a los riesgos (R) y la seguridad (S).

R36/38 Irrita los ojos y la piel.
S26/28 En caso de contacto con los ojos lávelos inmediata y abundantemente con agua y acuda a un médico. En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

El ***concentrado para el lavado de la placa (20X)*** contiene un 2% de cloroacetamida, clasificada como irritante (Xi) por las directivas de la Comunidad Económica Europea (CEE) que son de aplicación. A continuación figuran las frases correspondientes a los riesgos (R) y la seguridad (S).

R22-43 Nocivo por ingestión. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.
S22-36/37-45 No respirar el polvo. Use indumentaria y guantes de protección adecuados. En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta).

1. Evite la contaminación microbiana de los reactivos al abrirlos y al extraer partes alícuotas de los viales o frascos originales.
2. No pipetee con la boca.
3. Manipule las muestras, las microplacas y los controles reactivos y no reactivos como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
4. Use bata de laboratorio y guantes desechables mientras realiza el ensayo. Deseche los guantes en bolsas para residuos biopeligrosos. Lávese bien las manos al finalizar.
5. Es muy recomendable que este ensayo se lleve a cabo en una cámara de bioseguridad.
6. Mantenga el material alejado de bebidas y alimentos.
7. En caso de accidente o contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acuda a un médico.
8. Acuda a un médico de inmediato si ingiere material contaminado o si éste entra en contacto con heridas abiertas u otras lesiones de la piel.
9. El ácido clorhídrico puede provocar quemaduras. **EVITE EL CONTACTO.** Si entra en contacto con la piel, lávese minuciosamente con agua.
10. Evite el contacto del ácido clorhídrico con metales o agentes oxidantes.
11. No exponga a la luz intensa el comprimido sustrato ni el tampón. Utilice pinzas que no sean metálicas para manipular el comprimido de OPD.
12. Nunca añada agua a la solución de parada.
13. Limpie de inmediato los vertidos de material potencialmente infeccioso con un papel absorbente y lave la zona contaminada con una solución de hipoclorito sódico al 1% antes de reanudar el trabajo. El hipoclorito sódico no debe utilizarse para vertidos de ácido contaminantes, a menos que se seque la zona previamente con papel absorbente. Para su eliminación, el material utilizado (incluidos los guantes desechables) debe tratarse como material potencialmente biopeligroso. No utilice el autoclave para el material que contenga hipoclorito sódico.
14. Esterilice en autoclave todos los materiales usados y contaminados a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos antes de desecharlos. Otra opción consiste en descontaminar los materiales con una solución de hipoclorito sódico al 5% durante 30-60 minutos antes de desecharlos en bolsas para residuos biopeligrosos.
15. Descontamine todos los productos químicos y reactivos usados añadiéndoles un volumen de hipoclorito sódico suficiente como para conseguir una concentración final de al menos el 1%. Déjelos en reposo durante 30 minutos para lograr una descontaminación eficaz.

PRECAUCIONES ANALÍTICAS

1. Se pueden utilizar muestras de suero o plasma con EDTA, heparina o citrato sódico. Antes de guardar las muestras, verifique que se hayan separado por centrifugación los coágulos o las células sanguíneas.
2. Para obtener un rendimiento óptimo del ensayo es necesario un **CUMPLIMIENTO ESTRICTO** del procedimiento descrito en el presente Manual de instrucciones. Cualquier modificación del procedimiento puede provocar resultados anómalos.
3. **NO CAMBIE NI SUSTITUYA LOS REACTIVOS DE UN LOTE DEL KIT POR LOS DE OTRO.** Los controles, el conjugado y las microplacas están ajustados para un rendimiento óptimo. Use sólo los reactivos que se suministran con el kit.
4. No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad que figura en la caja.
5. Evite la contaminación microbiana de los reactivos al abrirlos y al extraer partes alícuotas de los viales o frascos originales, ya que ello reduciría de forma prematura el periodo de validez de los kits y daría lugar a resultados erróneos. Al extraer partes alícuotas de los viales utilice técnicas asépticas, como pipetas o puntas de pipeta desechables.
6. Para evitar la contaminación cruzada, use una punta de pipeta nueva para cada alícuota que se extraiga de la muestra y no toque el borde ni el fondo de las tiras, el borde de los pocillos ni el líquido de los mismos con los dedos ni con las puntas de pipeta.
7. Se aconseja lavar el material de vidrio que se vaya a utilizar para los reactivos con ácido clorhídrico 2 M y aclararlo bien con agua destilada o desionizada antes de usarlo.
8. Para obtener mejores resultados, permita que todos los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (25 °C ± 3 °C) antes de usarlos. Inmediatamente después del uso, vuélvalos a conservar a 2 °C - 8 °C.
9. Utilice sólo agua destilada o desionizada de calidad reactivo para diluir los reactivos.
10. Todos los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso.
11. La solución del conjugado de trabajo y el tampón de lavado diluido **deben estar recién preparados.**
12. No exponga los reactivos ni realice los análisis en un área en la que exista un nivel elevado de vapores de desinfectantes químicos (p. ej., vapores de hipoclorito) durante las etapas de almacenamiento y de incubación, ya que el contacto con los mismos inhibe la reacción colorimétrica. Los reactivos tampoco deben exponerse a la luz intensa.

13. Deje las microplacas en su bolsa de almacenamiento hasta el momento inmediatamente anterior a su uso. Las tiras abiertas que no se hayan utilizado deben conservarse a 2 °C - 8 °C dentro de su bolsa de almacenamiento y con el desecante suministrado.
14. Los controles del kit deben analizarse al mismo tiempo que las muestras clínicas en cada serie de análisis.
15. Debe evitarse tocar o salpicar el borde del pocillo con el conjugado. No “exprima” la micropipeta. Se aconseja el pipeteo invertido siempre que sea posible.
16. El uso de muestras muy hemolizadas, sueros no totalmente coagulados, muestras de plasma con fibrina o muestras con contaminación microbiana puede causar resultados erróneos.
17. **NO INCUBE LAS PLACAS AL BAÑO MARÍA.**
18. No deben usarse incubadoras de CO_2.
19. Durante la incubación a 37 °C, es necesario evitar la evaporación. Cubra las placas con las tapas adhesivas suministradas a tal fin.
20. Evite abrir y cerrar repetidamente la puerta del incubador durante las etapas de incubación.
21. No almacene la solución de detención en una placa plana, ni la devuelva a un frasco de reserva después de usarla.
22. Asegúrese de que el fondo de la placa esté limpio y seco y que la superficie del líquido no presente burbujas antes de leer la placa. Elimine todas las burbujas del pocillo, por ejemplo mediante golpecitos suaves.
23. Asegúrese de que el equipo automatizado haya sido validado antes de su uso.
24. Para evitar la contaminación por arrastre de muestras muy reactivas a muestras no reactivas, es muy recomendable realizar el mantenimiento sistemático del sistema de aspiración y lavado.

INSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN

1. Conserve el kit del ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD y sus componentes a 2 °C - 8 °C cuando no se esté utilizando.
2. Todos los reactivos y tiras de análisis en estado Cerrado o sin abrir, si se conservan a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad que figura en el kit. No congele los reactivos.
3. La estabilidad del kit una vez abierto por primera vez es de 12 meses. En cualquier caso, la caducidad del kit coincidirá con la primera fecha que se alcance, ya sea en el estado **Cerrado** (fecha que figura en el kit) o **Abierto** (12 meses a partir de la apertura).
4. Las microplacas abiertas que no se hayan utilizado deben conservarse a 2 °C - 8 °C en una bolsa cerrada y con el desecante suministrado.
5. Cuando el concentrado para el lavado de la placa (20x) se conserva a 2 °C - 8 °C pueden formarse cristales, que deben disolverse por calentamiento a 37 °C antes de su uso.
6. Cuando el diluyente se conserva a 2 °C - 8 °C puede precipitar; ello no afecta al rendimiento del kit.

RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se pueden utilizar muestras de suero o plasma con EDTA, heparina o citrato sódico. Antes de guardar las muestras, verifique que se hayan separado por centrifugación los coágulos o las células sanguíneas.

Las muestras deben conservarse a 2 °C - 8 °C si el análisis se va a llevar a cabo en los 7 días posteriores a la extracción, o congelarse a una temperatura de al menos -20 °C si el análisis se va a retrasar más de 7 días. Es preferible utilizar muestras transparentes y no hemolizadas. Las muestras lipémicas, ictéricas o contaminadas (por partículas) deben filtrarse (0,45 µm) o centrifugarse antes del ensayo.

El suero de los pacientes puede estar inactivado, pero no es un requisito indispensable para el rendimiento óptimo del análisis.
Para efectuar la inactivación:
1. Afloje las tapas de los recipientes con el suero.
2. Caliente el suero a 56 °C durante 30 minutos al baño María.
3. Deje enfriar el suero antes de volver a ajustar las tapas.
4. El suero puede conservarse congelado hasta el análisis.

Recomendamos que el suero de los pacientes no se someta a ciclos repetidos de congelación y descongelación.

MATERIAL ADICIONAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

1. Papel absorbente desechable para el banco de trabajo y toallas de papel.
2. Recipientes o tubos de polipropileno.
3. Pipetas graduadas: 5 ml, 10 ml.
4. Pipeta multicanal capaz de dispensar 50 µl, 100 µl y 200 µl.
5. Pipeta capaz de dispensar 1-1000 µl.
6. Puntas de pipeta desechables.
7. Recipientes para reactivos (cubetas) con capacidad para 25 ml.
8. Agua destilada o desionizada de calidad reactivo.
9. Matraces: 500 ml, 1 litro.
10. Lavador de microplacas ELISA. Otra posibilidad consiste en realizar el lavado manualmente con un pipeteador multicanal capaz de dispensar volúmenes de 0,3 ml y un dispositivo aspirador.
11. Incubador a 37 ± 1°C.
12. Lector de placas para microensayos de longitud de onda doble (A_{450}-A_{620}) o sencilla (A_{450}).
13. Solución de hipoclorito sódico al 5% o lejía doméstica líquida.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. CONJUGADO DE TRABAJO

a. El CONJUGADO DE TRABAJO **debe estar recién preparado.**

b. Para preparar el conjugado diluido, diluya a 1:500 el conjugado con el diluyente suministrado en el kit; por ejemplo, 10 µl de conjugado en 5ml de diluyente.

c. Utilice únicamente tubos o recipientes de polipropileno.

d. Se precisan 12,0 ml de solución del CONJUGADO DE TRABAJO para cada microplaca.

TABLA DE PREPARACIÓN DEL CONJUGADO		
Número de pruebas	Vol. de conjugado (µl)	Vol. de diluyente (ml)
24	10,0	5,0
48	15,0	7,5
72	20,0	10,0
96	24,0	12,0

2. TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO

a. El TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO **debe estar recién preparado.**

b. Diluya 1 volumen de CONCENTRADO PARA EL LAVADO DE LA PLACA con 19 volúmenes de agua destilada (de calidad reactivo). Mezcle bien. Se necesitan aproximadamente 400 ml de tampón de lavado para lavar 1 placa.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

IMPORTANTE: los inmunoensayos de este tipo son sensibles a la temperatura y al paso del tiempo. El cumplimiento estricto del procedimiento del ensayo garantiza un rendimiento óptimo del mismo. Cualquier modificación del procedimiento recomendado puede provocar resultados anómalos.

1. Extraiga la microplaca de la bolsa de aluminio.

2. Agite la muestra y los viales de los controles antes de su uso.

3. Llene un recipiente para reactivos con el **DILUYENTE.** Mediante un pipeteador multicanal, añada 200 µl de **DILUYENTE** en todos los pocillos. — 200 µl

4. Los pocillos A1 y B1 son **"BLANCOS". NO AÑADA MUESTRAS EN ESOS POCILLOS.** Vierta otros 20 µl de diluyente en esos pocillos. — 20 µl

5. Añada 20 µl de muestra al pocillo asignado, empezando por el pocillo H1. Con ello obtendrá una dilución final de la muestra de 1: 11. **NO DISPENSE MUESTRA EN UN POCILLO VACÍO.** — 20 µl

6. Tras haber dispensado la muestra problema, añada 20 µl de **CONTROL NO REACTIVO** por pocillo a los pocillos C1 y D1. — 20 µl

7. Dispense 20 µl de **CONTROL REACTIVO** por pocillo en los pocillos E1, F1 y G1. Mezcle bien mediante golpecitos suaves en todos los laterales de la microplaca, asegurándose de mantener la placa horizontal en la mesa de trabajo. — 20 µl

8. Cubra con cuidado la microplaca con una de las tapas suministradas para evitar la evaporación durante la incubación.

9. **Incube durante 60 minutos a 37 °C (no use baño María a 37 °C para la incubación).** — 60 minutos

10. Prepare el **CONJUGADO DE TRABAJO** tal y como se describe en **PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS** antes de lavar la microplaca.

11. Retire y deseche la tapa de la placa y lave la microplaca con el **TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO** siguiendo uno de los dos métodos recomendados. — 300 µl por pocillo por lavado

A. Lavado automático o semiautomático de la microplaca: lave seis (6) veces con al menos 300 µl por pocillo por lavado.

B. Lavado manual de la microplaca: aspire la totalidad del contenido de todos los pocillos bajando la punta del aspirador lentamente hasta el fondo de cada pocillo. **TENGA CUIDADO DE NO ROZAR LA SUPERFICIE INTERIOR DEL POCILLO.** Llene la placa completa con al menos 300 µl/pocillo y, a continuación, aspire inmediatamente en el mismo orden. Repita este ciclo seis (6) veces.

12. Invierta la microplaca y presiónela con firmeza sobre papel absorbente para secarla. El papel absorbente debe eliminar cualquier resto del tampón de lavado que quede en la placa, ya que éste puede inhibir la aparición de color durante la incubación del sustrato.

13. Llene un recipiente para reactivos con el **CONJUGADO DE TRABAJO.** Mediante la pipeta multicanal, dispense 100 µl de **CONJUGADO DE TRABAJO** en cada pocillo. Ponga otra tapa para placa. — 100 µl

14. **Incube la microplaca durante 30 minutos a 37 °C (no use baño María a 37 °C para la incubación).** — 30 minutos

15. Retire y deseche la tapa de la placa. Repita el procedimiento de lavado descrito en los pasos 11 y 12.

16. Rellene un recipiente de reactivo con **SUSTRATO.** Mediante un pipeteador multicanal, dispense 100 µl de **SOLUCIÓN SUSTRATO DE TRABAJO** en cada pocillo. Ponga una tapa para placa. — 100 µl

17. Incube durante 15 minutos en la oscuridad a 37 °C. **(No use baño María a 37 °C para la incubación).** — 15 minutos

18. Retire y deseche la tapa de la placa.

19. Mediante la pipeta multicanal, dispense 100 µl de SOLUCIÓN DE DETENCIÓN en cada pocillo. Mezcle suavemente mediante golpecitos en la placa. — 100 µl

20. Determine la absorbancia de cada pocillo a 450nm. Si se utiliza un dispositivo con filtro doble, la longitud de onda de referencia debe ser de 620 nm.

NOTA: La absorbancia debería leerse en el plazo máximo de 10 minutos tras la adición de la SOLUCIÓN DE PARADA.

CONTROL DE CALIDAD

1. El BLANCO y el CONTROL NO REACTIVO deben analizarse por duplicado y el CONTROL REACTIVO debe analizarse por triplicado en cada placa y en todas las series de muestras.

2. Los valores de absorbancia del blanco deben ser de ≤ 0,100.

3. Los valores de absorbancia del control no reactivo deben ser menores o iguales ≤ 0,100 tras restar el valor del blanco.

4. Al menos dos de los tres valores del control reactivo deben tener una absorbancia ≥ 0,800 después de restar los valores del blanco. Para el cálculo de la media del control reactivo ($\bar{x}$CR) no debe usarse ningún valor que se salga de este intervalo.

5. Si 2 o más de los valores del control reactivo se desvían en más del 30% de la MEDIA, el análisis NO ES VÁLIDO y habrá que repetir la serie.

6. Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre las absorbancias medias del control reactivo y el control no reactivo ($\bar{x}$CR - $\bar{x}$CNR) debe ser mayor o igual a 0,700. En caso contrario, debe sospecharse un error en la técnica y habrá que repetir el ensayo. Si la diferencia entre las absorbancias MEDIAS ($\bar{x}$CR - $\bar{x}$CNR) da cifras bajas sistemáticamente, debe sospecharse que los reactivos se han deteriorado.

RESULTADOS

Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas que se hayan procesado a la vez.

LOS VALORES DE LA ABSORBANCIA MEDIA DEL BLANCO DEBEN RESTARSE DE TODOS LOS VALORES DE ABSORBANCIA DE LA PLACA ANTES DE INTERPRETAR LOS RESULTADOS.

La presencia o ausencia de anticuerpos específicos frente a HTLV-I/II se determina relacionando la absorbancia de las muestras con el VALOR LÍMITE (VL) de la placa.

El VALOR LÍMITE se calcula como (0,45 unidades de absorbancia + absorbancia media del CNR):

VALOR LÍMITE = 0,45 + $\bar{x}$CNR

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Cálculo de la absorbancia media del control no reactivo ($\bar{x}$CNR)

Ejemplo:	N° de pocillo	Absorbancia
	C1	0,020
	D1	0,022
	Total	0,042
	Media	0,042 / 2 = 0,021 ($\bar{x}$CNR)

Los valores del control no reactivo individuales deberían ser ≤ 0,100 unidades.

Si uno de los valores del control no reactivo no cumple los dos criterios anteriores, el ensayo no es válido y habrá que repetirlo.

2. Cálculo de la absorbancia media del control reactivo ($\bar{x}$CR)

Ejemplo:	N° de pocillo	Absorbancia
	E1	1,221
	F1	1,144
	G1	1,298
	Total	3,663
	Media	3,663 / 3 = 1,221 ($\bar{x}$CR)

Los valores del control reactivo individuales deberían ser ≥ 0,800 unidades.

Si uno de los valores del control reactivo no cumple los criterios anteriores, se debe excluir como anómalo. En ese caso, la media del control reactivo ($\bar{x}$CR) debe volver a calcularse utilizando los valores individuales del control reactivo restantes. Todos los valores individuales del control reactivo restantes deben cumplir los criterios anteriores; de lo contrario, el ensayo no es válido y habrá que repetirlo.

3. Cálculo de la diferencia entre $\bar{x}$CR y $\bar{x}$CNR

Ejemplo:	$\bar{x}$CNR	= 0,021
	$\bar{x}$CR	= 1,221
	$\bar{x}$CR - $\bar{x}$CNR	= 1,221 - 0,021
		= 1,200

Para que el ensayo sea válido, el valor $\bar{x}$CR - $\bar{x}$CNR debe ser mayor o igual a 0,700. En caso contrario, debe sospecharse un error en la técnica o el deterioro de los reactivos y habrá que repetir el ensayo.

4. Cálculo del valor LÍMITE

	Valor LÍMITE	= 0,450 + $\bar{x}$CNR
Ejemplo:	$\bar{x}$CNR	= 0,021
	Valor LÍMITE	= 0,450 + 0,021
		= 0,471

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. El ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD considera **no reactivas** las muestras con valores de absorbancia menores que el valor LÍMITE.
2. Las muestras con valores de absorbancia **mayores o iguales que** el valor UMBRAL se consideran **inicialmente reactivos** según el criterio del ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD y deberían volver a analizarse por duplicado antes de su interpretación.
3. El ensayo ELISA para ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD considera que las muestras que resultan reactivas al repetir el análisis pueden interpretarse como muestras con **reactividad repetida** para los anticuerpos frente a HTLV-I/II.
4. El ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD considera que las muestras que son inicialmente reactivas y resultan **no reactivas** al repetir el análisis son **negativas.**
5. Las muestras con reactividad repetida en el ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD deben analizarse con métodos adicionales más específicos, como el ensayo HTLV BLOT 2.4 de MPD .

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

El ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD (versión TMB) equivale al ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD (versión OPD). Desde los puntos de vista técnico y biológico, comparten similitudes en:

- condiciones de uso;
- especificaciones / propiedades;
- diseño;
- métodos de aplicación;
- principios de funcionamiento; y
- materiales en contacto con los mismos fluidos corporales.

Los ensayos difieren en cuanto a:

- el sustrato utilizado (OPD frente a TMB);
- el tipo y volumen de solución de detención necesario (ácido sulfúrico frente a ácido clorhídrico); y
- la longitud de onda en la que se ha leído el ensayo (492 frente a 450 nm).

Por tanto, se evaluó el ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD para detectar anticuerpos frente al HTLV-I y el HTLV-II mediante la versión OPD. Las características del ensayo obtenidas como se indica a continuación se extrapolaron a la versión TMB.

NOTA: el estudio australiano se realizó con los sistemas del sustrato OPD y TMB y se descubrió que concordaba [155/155] para ambos tipos de sustrato (≥ 99,9%).

Sensibilidad
420 muestras reactivas (positivas en ensayo ELISA y/o ensayo de Western blot) se estudiaron en tres evaluaciones independientes realizadas en tres lugares distintos: internamente, en Suecia y en Australia. El estudio sueco (n=163) indica una sensibilidad equiparable a la de una prueba Elisa de referencia. Mientras que la evaluación australiana (n=155) arrojó una sensibilidad del 100%, la valoración interna, basada en muestras comerciales y en el panel comercial de título variado PRP206, mostró una sensibilidad del 99% (105/106). La única muestra negativa detectada con el ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD en la evaluación interna dio también negativo en un ensayo ELISA de la competencia y arrojó un resultado indeterminado en el ensayo de Western blot, con una presencia de bandas débiles GD21 y p19.

Las tres evaluaciones indicaron una sensibilidad global superior al 99,7%.

Especificidad
Se analizó un total de 5.300 muestras, que incluían donantes de sangre aleatorios (5.000), muestras clínicas (200) y muestras que podían interferir potencialmente (100) en el estudio. La especificidad de diagnóstico en los grupos de donantes de sangre aleatorios, de muestras clínicas y de grupos que podían interferir potencialmente fue del 99,8%, 98% y 97% respectivamente. El ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD demostró una alta especificidad, superior al 99% en los tres lotes de muestras analizados.

Reproducibilidad
La reproducibilidad interlote e intralote del ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD se evaluó internamente con los controles del kit, una muestra positiva para el HTLV-I, una muestra negativa para el HTLV-I/II y con ACCURUN 24, un ensayo confirmatorio multimarcador de BBI.

Interlote: se analizaron dos lotes de microplacas en cuatro ocasiones distintas con tres duplicados de cada control de kit y 8 duplicados de las muestras restantes en cada ocasión.

Intralote: se analizó un lote de microplacas con 8 duplicados de cada muestra dos veces el mismo día y se realizaron los controles del kit de cada ensayo en cuatro días distintos.

Los resultados indicaron que el coeficiente de variación (CV) en as muestras analizadas se situaba entre el 3 y el 8%.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

Un resultado de reactividad repetida con el ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD indica presunción de anticuerpos frente a HTLV-I/II en la muestra. Un resultado **NO REACTIVO** con el ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD indica la probable ausencia de anticuerpos frente a HTLV-I/II detectables en la muestra. Sin embargo, no existen datos suficientes para descartar la transmisión de HTLV-I/II en muestras de sangre en las que se ha determinado la no reactividad con el ensayo ELISA para HTLV I/II 3.0 de MPD . Por lo tanto, un resultado **NEGATIVO** no descarta la posibilidad de exposición a HTLV-I/II ni de infección por estos virus.

En un kit de ensayo de este tipo pueden sospecharse resultados falsamente reactivos. La proporción de falsos reactivos depende de la sensibilidad y la especificidad del kit de ensayo. En la mayoría de los ensayos de detección selectiva, cuanto mayor sea la prevalencia de anticuerpos frente al HTLV-I/II en una población menor será la proporción de muestras falsamente reactivas.

CLÁUSULA DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

La única garantía expresa que otorga el fabricante es que el kit de análisis funcionará como ensayo diagnóstico *in vitro*, de acuerdo con las especificaciones y limitaciones descritas en el Manual de instrucciones del producto, cuando se use de conformidad con las instrucciones citadas en el mismo. El fabricante rehúsa cualquier garantía, expresa o implícita, incluida la garantía expresa o implícita relativa a la comercialización, adecuación para el uso o supuesta utilidad para otros fines. El fabricante sólo se obliga a la sustitución del producto o al reembolso del precio de compra del mismo. El fabricante no será responsable ante el comprador ni ante terceros de cualesquiera daños, perjuicios o pérdidas económicas provocados por la utilización o la aplicación del producto.

PROBLEMAS TÉCNICOS Y RECLAMACIONES

En caso de problemas técnicos o si desea presentar una reclamación, proceda de la siguiente manera:

1. Anote el número de lote del kit y su fecha de caducidad.
2. Conserve los kits y los resultados obtenidos.
3. Póngase en contacto con la oficina de MP Biomedicals más cercana o con su distribuidor local.

BIBLIOGRAFÍA

1. Poisez B.J. et al., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77:7145-7419.

2. Kalyanaraman V.S., et al., A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218:571-573.

3. Williams A.E. et al., Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science 1988; 240:643-646.

4. Lipka J.J., et. al., 1990. Enhancing the sensitivity of HTLV-I immunoassays in Human Retrovirology : HTLV, Edt W.A. Blattner, Raven Press (NY). pp 409-475.

5. Lee H. et. al., High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. Science 1989; 244:471-475.

6. Lipka J.J. et. al., Modified Western Blot Assay for confirmation and differentiation of Human T-cell Lymphotropic Virus Type-I and II. J. Infect Dis. 1991; 164:400-403.

7. Lipka J.J. et. al., Segregation of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I and II infections by Antibody Reactivity to Unique Viral Epitopes.J. Infect. Dis. 1992; 165:268-272.

8. Hadlock K.G., Goh C.J., Bradshaw P.A.,Perkins S., Lo J., Habbas R.K., Kaplan L., and Foung S.K.H. Delineation of an Immunodominant and highly HTLV specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. Blood 1995; 68 (4):392-1399.

9. Varma M., Rudolph D., Knuchel M., Switzer W., Hadlock K.G., Velligan M., Chan L., Foung S.K.H., and Lal R.B., Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of HTLV-I and HTLV-II infection by Western Blot assay containing recombinant envelope glycoproteins.J.Clin.Micro,1995; 33(12):3239-3244.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapur 118259
Tel.: + 65 6775 0008
Fax: + 65 6775 4536
Correo electrónico: enquiry_ap@mpbio.com

EC REP

Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St.Ingbert
Alemania
Tel.: + 49 68 94 58 1020
Fax: + 49 68 94 58 1021
Correo electrónico: info@mt-procons.com

Oficinas regionales:

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
Apartado de correos 1015
1211 Ginebra 5
Suiza
Tel. : (4122) 788-1908
Fax : (4122) 788-1986
Correo electrónico: mpbiosuisse@mpbio.com

* Patente en Australia	613350, 667189, 690540
* Patente en Estados Unidos	5,066,579, 5,614,366 5,763,572, 5,814,441 5,871,933, 5,643,714
* Patente en Canadá	1337799
* Patente en Europa	0395634
* Patente en Japón	2559482

* El nombre y el logotipo de Genelabs cuentan con licencia de Genelabs Technologies, Inc.